

Title	PKC α suppresses osteoblastic differentiation
Author(s)	名倉, 温雄
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58213
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	な　　名　　くら　あき　お
氏名	倉　　温　　雄
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２　４　４　２　５　号
学　位　授　与　年　月　日	平　成　23　年　3　月　25　日
学　位　授　与　の　要　件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	PKC α suppresses osteoblastic differentiation (PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用する)
論　文　審　査　委　員	(主査) 教　授　吉川　　秀樹 (副査) 教　授　仲野　　徹　　教授　大藺　　恵一

論　文　内　容　の　要　旨

〔　　目　　的　　〕

Protein Kinase C (PKC)は、構造や性質から11種の類型 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ε 、 η 、 θ 、 μ 、 ζ 、 λ) に分類され、それぞれが個々の役割を果たし、または相互作用を及ぼしながら、様々な生体内反応に寄与している。特にPKC α は、ubiquitousに発現しており、臨床においては循環器系や腫瘍分野などで細胞分化や細胞増殖の活性化シグナルの一端を担い病態に深く関与しているとの報告がある。骨代謝におけるPKC α の役割は、骨芽細胞増殖に促進的に働くという報告があるが、骨芽細胞分化における役割は解明されていない。我々は、PKC α の骨芽細胞分化における役割を解析した。

〔　　方　　法　　〕

マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1細胞を用いて、PKCの阻害剤G6976、PKC β inhibitorと、PKCの促進作用のあるTPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)を投与し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、ALP活性の定量、mRNAにおける骨芽細胞分化マーカー、転写因子の変化と、Alizarin red染色による骨芽細胞分化への影響を解析した。さらに、siRNAを用いて選択的にPKC α をknockdownし、逆に、adenovirus vectorを用いてPKC α のoverexpressionを行い、同様の評価を行った。また、これらのinhibitorやactivator、adenovirus vectorを用いることによる骨芽細胞増殖の変化をWST-1 assayで評価した。

〔　　成　　積　　〕

MC3T3-E1細胞にPKC α とPKC β Iを阻害するG6976を投与すると、濃度依存性にALP活性は亢進し、mRNAでも骨芽細胞分化マーカーの発現増強、そして、Alizarin red染色での濃染を示した。一方、PKC β IとPKC β IIの阻害剤であるPKC β inhibitorは、骨芽細胞分化に影響を認めなかった。また、PKCの促進作用のあるTPAでは、濃度依存性に骨芽細胞分化の抑制を認めた。siRNAを用いたPKC α のknockdownでは、骨芽細胞分化の亢進を認めた。また、PKC α のknockdownの状況下でTPA 5nMを加えると、コントロール群と比べてALP活性の抑制は減弱しており、PKC α が骨芽細胞分化の抑制に寄与していることが確認された。逆に、PKC α のoverexpressionの状況下では、骨芽細胞分化の抑制が確認された。

G6976で骨芽細胞分化が亢進し、PKC β inhibitorで影響を認めなかったことから、PKC α が骨芽細胞分化に抑制的な役割を果たしていると推測された。これは、PKC α のknockdownやoverexpressionによってもそれが確認された。また、マウス骨髄間葉系細胞のST2にもPKCの阻害剤を用いて同様の解析を行い、同じような結果が得られている。

加えて我々は、PKC α の下流のシグナル伝達の解析を行った。一般的にPKC α の下流では、p44/42 MAPKのリン酸化に影響が及び、さらに、その変化が転写因子に伝達されるといった報告が多い。しかしながら、我々の解析では、PKCの阻害剤やPKC α のknockdown、overexpressionの状況下でp44/42 MAPKのリン酸化の有意な変化を認めることはできなかった。

骨芽細胞分化に関しては、これまでにPKC α は促進的に働くことが報告されており、我々の結果でもMC3T3-E1細胞のG6976投与下では増殖能の低下を認め、adenovirusによるPKC α のoverexpressionの状況下では増殖能の亢進を認めた。

〔　　総　　括　　〕

PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用していることが示された。一方、骨芽細胞増殖には、促進的に作用している。PKC α は、骨芽細胞の分化と増殖という相反する細胞活動に極めて重要な働きを持っている可能性がある。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

Protein Kinase C (PKC)の特にPKC α は、多様なシグナル伝達物質の一つとして様々な病態に深く関与している。しかし、骨代謝においてPKC α の骨芽細胞分化における役割は解明されていない。そこでPKC α の骨芽細胞分化における役割を解析した。マウス前骨芽細胞株MC3T3-E1を用いて、G6976、PKC β inhibitor、TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)を投与し、骨芽細胞分化への影響を解析した。さらに、PKC α のknockdownやoverexpressionの状況下で同様の評価を行った。PKC α とPKC β Iを阻害するG6976を投与すると、濃度依存性にALP活性は亢進し、mRNAでも骨芽細胞分化マーカーの増強、Alizarin red染色での濃染を認めた。一方、PKC β IとPKC β IIの阻害剤であるPKC β inhibitorは、骨芽細胞分化に影響を認めなかった。また、PKCの促進作用のあるTPAは、濃度依存性に骨芽細胞分化の抑制を認めた。siRNAを用いたPKC α のknockdownでは、骨芽細胞分化の亢進を認めた。さらに、PKC α のoverexpressionの状況下でも骨芽細胞分化の抑制が確認された。PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用していることが示された。一方、骨芽細胞増殖には促進的に作用することが報告されており、我々も確認できた。以上よりPKC α は骨芽細胞分化に抑制的に働き、骨芽細胞の「分化」と「増殖」という相反する細胞活動に極めて重要な働きを持っている可能性がある。

今後は、PKC α の上流と下流のシグナル伝達に関して、さらなる検討が必要である。また、ubiquitousに存在するPKC α がどのような形で骨代謝の臨床応用に拡張られるか、他の臓器、組織におけるPKC α の役割も考慮して検討していく。

以上の研究報告に対して、学位の授与に値すると考えられる。